

# Perancangan Primer Oligonukleotida untuk Polimerisasi *in Vitro* Gen Sukrosa Sintase

Pieter Agusthinus Riupassa

Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Pattimura, Kotak Pos 95 Jalan Ir. M. Putuhena, Kampus Poka  
Ambon 97233, Tel. +62-911-3301115

## Abstract

The most important problems in using polymerase chain reaction (PCR) are the efficiency of energy, cost and time due to gene amplification. Oligonucleotide primer design of sucrose synthase gene was conducted as a model of preliminary experiment to amplify gene using PCR. In plant cells, this gene plays an important role in carbohydrate metabolism, a sucrose molecule break down into glucose. This design involved some computer software as bioinformatics tools. Five data sequences of legumes were downloaded from gene bank using accession number of AF030231, AJ311496, X92378, X69773, and D10266 belongs to soybean, pea, alnus bean, fava bean, and mung bean, respectively. After sequences alignment, some conservative regions were determined as the basis to construct forward and reverse primer candidates. Furthermore, the candidates were tested for compatibility. The results showed that the oligonucleotide primers can amplify sucrose synthase gene with  $\pm 1462$  bp fragment size using 5'-AACTTTgTgCTTgA-3' and 5'-TCCTTTgACTCCTTC-3' for forward and reverse primer, respectively. Even the PCR process weren't applied, those primers might be universal primers to amplify sucrose synthase gene of legume plants.

**Key words:** sucrose synthase, oligonucleotide primes, PCR, bioinformatics

## Pendahuluan

Perancangan primer oligonukleotida memegang peran yang sangat penting dalam kegiatan biologi molekuler. Perancangan ini diharapkan akan menghasilkan primer spesifik yang dapat digunakan dalam proses perbanyakan (amplifikasi) DNA. Primer adalah nukleotida pendek berukuran 12-20 basa yang diperlukan sebagai titik pelekatan enzim polimerase DNA pada proses pembentukan atau pemanjangan DNA suatu gen spesifik secara *in vitro* melalui teknik reaksi rantai polimerisasi (*polymerase chain reaction*, PCR). Teknik PCR ditemukan secara tidak sengaja oleh Kary Mullis pada tahun 1989. Sebelum penemuan tersebut, para ahli telah mengetahui bahwa penggandaan materi genetik dapat terjadi di dalam tubuh (*in-vivo*) dan merupakan mekanisme yang umum. Namun, penemuan tersebut membuktikan bahwa reaksi polimerisasi DNA dapat juga terjadi di dalam tabung (*in-vitro*). Implementasi teknik PCR pada polimerisasi gen sukrosa sintase membutuhkan teknik perancangan primer yang tepat sehingga menghasilkan primer spesifik untuk deteksi gen.

Perancangan primer untuk gen yang berperan dalam metabolisme karbohidrat, sukrosa sintase, dapat dilakukan dengan memanfaatkan kode sekuens yang tersedia dan mudah diperoleh di internet pada beberapa situs, yaitu GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) yang mencakup koleksi data sekuens di Amerika, *European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute* / EMBL-EBI ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) mencakup Eropa, dan DDBJ ([www.ddbj.nig.ac.jp](http://www.ddbj.nig.ac.jp)) di Jepang. Ketiga situs tersebut saling bertukar informasi basis data sehingga tidak terjadi duplikasi data dan dengan cepat terjadi pembaharuan data. Penggunaan piranti lunak (*software*) Clustal-W dan NetPrimer telah memberikan kemudahan dalam perancangan ini. *Software* tersebut dapat dengan mudah dan cepat dieksekusi melalui hubungan komputer-internet. Dengan demikian, bioinformatika di Indonesia harus segera menjembatani para ahli genetika, biologi molekuler, biokimia, dan ilmu komputer dalam kegiatan rekayasa genetika secara terpadu.

Penggunaan data GeneBank, *software* Clustal-W (Higgins *et al.*, 1994; Pearson 1990), dan NetPrimer diperlukan dalam perancangan primer gen spesifik. Perancangan ini juga telah menghemat tenaga, uang, dan waktu daripada pekerjaan uji coba PCR

berulang-ulang di laboratorium. Studi perancangan primer merupakan kajian awal yang memudahkan pekerjaan molekuler terhadap suatu gen menggunakan teknik PCR.

Gen sukrosa sintase (*UDP-glucose: D-fructose-2 $\alpha$ -glucosyltransferase*, *SuSy*, *SS*, *nodulin-100*.) adalah gen yang menghasilkan enzim sukrosa sintase (EC 2.4.1.13), yang berperan penting dalam metabolisme karbohidrat. Enzim ini mengatalisis reaksi reversibel dari sukrosa uridin-difosfat menjadi fruktosa dan UDP-glukosa. Sukrosa sintase menyiapkan jalur UDP-glukosa untuk menghasilkan selulosa selama deposisi dinding sel (Haigler *et al.*, 2001). Peran sukrose sintase, suatu enzim tetramerik, dalam perombakan sukrosa pada bintil akar tanaman kedelai (*Glycine max*) dengan aktivitasnya dapat mencapai 20 kali lebih besar daripada di dalam jaringan akar (Thummler dan Verma 1987; Gordon 1999).

Perancangan primer dilakukan berdasarkan sekuens basa atau asam amino yang konservatif. Tingkat konservatif dapat diperoleh melalui penjajaran (*alignment*) beberapa sekuens. Bila data asam amino tersedia dalam perancangan primer, maka terlebih dahulu data tersebut dikonversi menjadi sekuens basa menurut urutan kodon tertentu (Dieffenbach dan Dveksler, 1995).

Primer adalah oligonukleotida sintetis, terdiri atas 12 hingga 20 basa, yang berfungsi sebagai prekursor sintesis DNA dari cetakan DNA. Oligonukleotida memiliki urutan sekuens berbeda dan komplementer dengan utas yang berlawanan pada cetakan DNA. Pada PCR diperlukan satu set primer yang masing-masing terletak di kedua ujung fragmen DNA target, yaitu primer *forward* (arah sintesis maju) dan *reverse* (arah sintesis terbalik), yang dikatalisis oleh DNA polimerase. PCR digunakan untuk memperbanyak segmen DNA, yang pada kedua ujungnya telah diketahui urutan basanya (Dieffenbach dan Dveksler, 1995).

Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam perancangan primer untuk mengoptimalkan perolehan hasil amplifikasi, yaitu terbebas dari pembentukan struktur sekunder (*hairpin*/struktur tusuk konde, *dimer/self-dimer*, dan *cross dimer*), besar ampikon, panjang primer, titik leleh ( $T_m$ ), dan kestabilan internal (Dieffenbach dan Dveksler, 1995).

Struktur sekunder pada primer dapat terjadi melalui tiga cara. Pertama, *hairpin* (struktur tusuk konde), yaitu komplementasi melalui pelipatan kembali dirinya akibat adanya ikatan intramolekul yang mampu memutar primer sehingga terjadi pengikatan sendiri. Kedua, *dimer* adalah komplementasi antarsesama primer. Ketiga, *cross dimer*, yang prosesnya hampir sama dengan dimer tetapi komplementasi terjadi antara primer *forward* dan *reverse* (Rychlik, 1995).

Temperatur leleh (*melting temperatur*,  $T_m$ ) primer adalah temperatur ketika 50% primer telah dapat menempel pada utas pasangannya. Temperatur ini dipengaruhi oleh rasio GC/AT primer. Makin besar ratio, makin tinggi temperatur. Temperatur yang rendah menghasilkan ampikon nonspesifik (*non-target*) dan mengurangi efisiensi amplifikasi karena primer yang telah menempel (*annealing* atau renaturasi) terlepas bila suhu dinaikkan pada saat sintesis (*elongation*) DNA. Temperatur kedua primer (*forward* dan *reverse*) yang tidak berselang jauh akan memudahkan penentuan waktu denaturasi (Rychlik, 1995). Freier *et al.* (1986) merumuskan perhitungan yang lebih akurat atas dasar teori termodinamik jarak terdekat (*nearest neighbor thermodynamic theory*) sebagai berikut.

$$T_m = \Delta H / (\Delta S + R \cdot \ln(C/4)) + 16.6 \log ([K^+]/(1 + 0.7 [K^+])) - 273.15$$

- $T_m$  : temperatur leleh primer
- $\Delta H$  : entalpi pembentukan struktur heliks
- $\Delta S$  : entropi pembentukan struktur heliks
- R : konstanta gas molar 1,987 kal mol<sup>-1</sup>°C
- C : konsentrasi asam nukleat

$K^+$  : konsentrasi garam (kation)

Stabilitas internal primer merupakan perbedaan kestabilan perlekatan primer ujung 5' dan ujung 3' pada DNA target. Primer dengan kestabilan ujung 5' yang lebih besar daripada ujung 3' pada umumnya memiliki interaksi spesifik primer-cetakan yang terbaik. Primer dengan kestabilan yang rendah pada ujung 3' berfungsi lebih baik karena perlekatan nontarget ujung 3' menjadi tidak stabil untuk diperpanjang oleh DNA polimerase (Rychlik, 1995).

*Multiple sequence alignment* adalah cara penyusunan lebih dari dua sekuens untuk memperoleh posisi basa (atau asam amino) yang lebih mementingkan kesamaannya. Proses ini dibantu dengan pendekatan skor matriks dan *gap penalties*, dan dengan cepat dapat dikerjakan dengan piranti lunak (ClustalW).

NetPrimer adalah piranti lunak yang digunakan dalam pengujian kelayakan primer untuk menghasilkan efisiensi interaksi primer-cetakan dan menghasilkan amplicon spesifik dalam PCR (Breslauer *et al.*, 1986; Freier *et al.*, 1986; Rychlik *et al.*, 1990).

## Materi dan Metode

Sekuens gen *sukrosa sintase* diperoleh dari situs internet bank data EMBL-EBI. Lima data sekuens tanaman yang diperoleh adalah kacang kedelai, kacang ercis, kacang alnus, kacang fava, dan kacang hijau, yang berturut-turut menggunakan nomor akses AF030231, AJ311496, X92378, X69773, dan D10266. Sekuens diperoleh berupa *file* dalam bentuk standar (*gene bank flatfile format*, GBFF). Sekuens DNA atau *coding sequence* (CDS) dituliskan kembali dalam format Fasta (Pearson, 1990) dan disimpan sebagai suatu *file* teks.

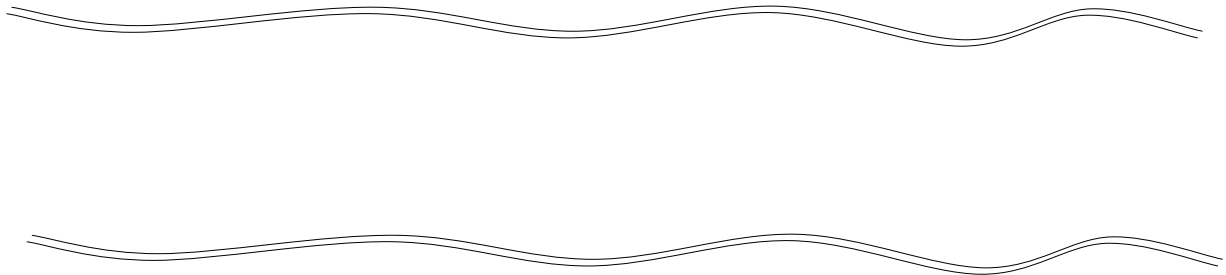
Situs internet <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html> digunakan untuk menjalankan piranti lunak ClustalW. *File* teks sekuens berformat Fasta dapat diupload dengan mengklik tombol perintah *browse* atau dengan prinsip *copy-paste* sekuens yang berformat Fasta ke dalam kotak teks *Sequences* (Higgins *et al.*, 1994). Klik tombol perintah *run* ClustalW digunakan untuk melakukan *alignment sequence*. Hasil analisis menunjukkan tanda “□” bila sekuens basa sama pada semua jenis tanaman. Tanda tersebut menunjukkan tingkat konservatif basa pada gen. Kandidat primer *forward* dan *reverse* dipilih bila dijumpai suatu bagian yang memiliki basa konservatif berjumlah 12 hingga 15 nukleotida. Dari hasil penjajaran dapat diperoleh tiga kandidat primer *forward* dan dua kandidat primer *reverse* (Gambar 1).

Pengujian kelayakan primer dilakukan menggunakan situs <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch.html>. Kandidat primer dianalisis untuk mengetahui kemungkinan terjadinya struktur *hairpin*, *dimer*, *cross dimer*, *palindrome*, dan *repeat and run*. Sekuens kandidat primer dimasukkan ke dalam kotak teks *Oligo Sequence 5'-3'*. Tombol *sense* dipilih ketika akan memasukkan sekuens untuk kandidat primer *forward*, sedangkan tombol *anti-sense* dipilih ketika akan memasukkan sekuens untuk kandidat primer *reverse*. Tombol perintah *analyze* diklik untuk menampilkan hasil pengujian kelayakan primer. Selanjutnya, tombol *tabstrip hairpin*, *dimer*, *cross dimer*, *palindrome*, dan *repeat and run* dipilih secara simultan untuk mengetahui hasil analisis kelayakan kandidat primer. Cara ini dilakukan untuk semua kandidat primer *forward* dan *reverse*. Tombol *print-screen* pada *keyboard* ditekan sehingga setiap tampilan analisis di layar monitor dapat terekam sebagai objek *clipboard* (gambar Bitmap) di memori komputer, dan dengan segera setiap saat dapat dilakukan *copy-paste* ke dokumen baru Microsoft® Word atau ke gambar Bitmap Microsoft® Paint, melalui menu Edit → Paste. Primer terbaik yang dipilih adalah primer yang tidak atau sedikit memiliki struktur *hairpin*, *dimer*, dan *cross dimer* (Breslauer *et al.*, 1986; Freier *et al.*, 1986; Rychlik, 1995).

5' TCCITTTGACTCCTTC ←

Gambar 1. Hasil penjajaran untuk mendapatkan tiga kandidat primer *forward* (F1, F2, dan F2.1) dan dua kandidat primer *reverse* (R1 dan R2). Garis bergelombang menjelaskan adanya penghapusan sebagian sekuens

Figure 1. Sequence alignment to obtain three candidates of *forward* primers (F1, F2, and F2.1) and two candidates of reverse primers (R1 and R2). Curve line shows deleted parts of sequences



## Hasil dan Pembahasan

Dari hasil analisis *multiple sequence alignment* dengan ClustalW diperoleh tiga kandidat primer *forward* dan dua kandidat primer *reverse* (Tabel 1). Penentuan kandidat primer didasarkan pula atas hasil analisis dengan NetPrimer untuk masing-masing primer tunggal. Bila tidak ditemukan *hairpin*, *dimer*, dan *palindrome*, maka kandidat primer ini digunakan untuk merancang satu set primer (*forward* dan *reverse*). Adanya sekuens berulang (*repeat and run*) tidak akan mempengaruhi prioritas urutan sebagai kandidat primer.

Tabel 1. Kandidat primer *forward* dan *reverse*  
Table 1. Candidates for forward and reverse primers

Kode	Sekuens	$\Sigma$ basa	$T_m$ (°C)	% GC	Repeat & Run	Keterangan
( . . . . . kandidat primer <i>forward</i> . . . . . )						
F2	5' AACTTTGTGCTTGA 3'	14	31,18	35,71	TTT	
F2.1	5' AACTTTGTGCTTGAG 3'	15	34,82	40,00	TTT	F2 + 1 basa G
F1	5' GTTCGTCCAAGGC 3'	13	37,36	61,54		
( . . . . . kandidat primer <i>reverse</i> . . . . . )						
R2	5' TCCTTTGACTCCTTC 3'	15	36,41	46,67	TTT	
R1	5' TTTATGAGCCAACAA 3'	15	37,09	33,33	TTT	

$T_m$  dihitung berdasarkan rumus Freier *et al.* (1986)

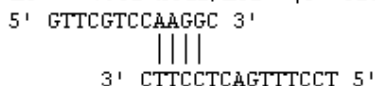
Tiga kandidat primer *forward* dan dua kandidat primer *reverse* dipasangkan secara simultan untuk menentukan satu set primer. Hasil analisis dengan NetPrimer mempertimbangkan terjadinya struktur *cross dimer* maksimum dua macam ditampilkan dalam Tabel 2. Sebaliknya, jika ditemukan struktur *cross dimer* lebih dari dua, maka secara langsung pasangan kandidat primer tidak dapat digunakan karena menurunkan efisiensi interaksi primer-cetakan.

Tabel 2. Pasangan satu set primer *forward-reverse* dengan pembentukan *cross dimer* maksimum 2 macam

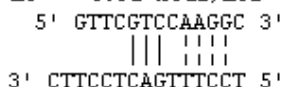
Table 2. Pair of primers with cross dimer formation of a maximum 2 types

No	Kode Set Primer <i>Forward-Reverse</i>	Dugaan panjang amplikon (bp)	Selisih $T_m$ antarprimer	Jumlah 3' <i>Cross Dimer</i>	Visualisasi 3' <i>cross-dimer</i>
1.	F2 – R2	1462	5,23	tidak ada	
2.	F2.1 – R2	1462	1,59	1	Gambar 2a
3.	F1 – R2	1588	0,95	2	Gambar 2b
4.	F1 – R1	1016	0,27	2	Gambar 2c

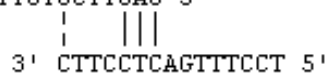
1.  $\Delta G = -7.61$  kcal/mol (3' Cross Dimer)



2.  $\Delta G = -3.92$  kcal/mol (3' Cross Dimer)



5' AACTTTGTGCTTGAG 3'

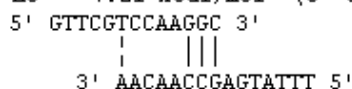


a)

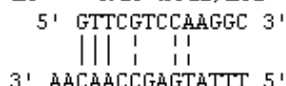
b)

c)

1.  $\Delta G = -7.21$  kcal/mol (3' Cross Dimer)



2.  $\Delta G = -4.29$  kcal/mol (3' Cross Dimer)



Gambar 2. Visualisasi struktur 3' *cross dimer* pada pasangan primer *forward-reverse*  
Figure 2. Visualization of 3' *cross dimer* structures in pairs of *forward-reverse* primers

Hasil analisis NetPrimer terhadap kandidat primer *forward-reverse* berdasarkan syarat kelayakan primer menunjukkan bahwa pasangan primer dengan kode F2 – R2 layak dijadikan sebagai primer (Tabel 1). Secara berturut-turut urutan sekuensnya adalah 5' AACTTTGTGCTTGAG 3' (panjang 14 basa) dan 5' TCCTTTGACTCCTTC 3' (panjang 15 basa). Dugaan panjang ampikon yang dihasilkan dalam proses amplifikasi (PCR) adalah  $\pm 1462$  pb.

Tiga set primer *forward-reverse* yang lain (F2.1-R1, F1-R2, dan F1-R1) tidak direkomendasikan untuk digunakan sebagai primer. Hal tersebut disertai dengan konsekuensi rendahnya ampikon yang dihasilkan karena rendahnya interaksi primer dengan cetakan oleh struktur *cross dimer* yang terbentuk. Namun, bila kepentingan pada persyaratan faktor selisih suhu  $T_m$  antarprimer kecil ( $1,59^\circ\text{C}$ ), dan persyaratan persentase GC primer *forward* yang lebih tinggi (dari 35,71 menjadi 40%) (Tabel 1), maka prioritas urutan pasangan primer yang disarankan adalah F2.1 – R2. Berturut-turut sekuensnya adalah 5' AACTTTGTGCTTGAG 3' (panjang 15 basa) dan 5' TCCTTTGACTCCTTC 3' (panjang 15 basa), disertai dengan konsekuensi terbentuknya satu macam *cross dimer* (Gambar 2a).

Kini dapat difahami bahwa dengan penambahan atau pengurangan satu basa mungkin memberikan arti penting dalam proses perancangan primer. Hal ini terjadi pada kandidat primer forward (F2.1) yang hanya dengan penambahan satu basa guanin telah menyebabkan struktur *cross dimer* dengan pasangan primer *reverse*-nya.

Penelitian ini masih pada tingkatan perancangan primer saja, dan belum pada tingkat selanjutnya, yaitu penggunaan primer dalam amplifikasi fragmen gen *sukrosa sintase* tanaman yang berkaitan dengan isolasi gen dan kloning.

Pemanfaatan piranti lunak yang lebih komprehensif lebih disarankan untuk menghasilkan primer yang baik. Primer Premier 5 dari Premier Biosoft International adalah *software* yang terintegrasi dengan keunggulan utama dalam perancangan primer untuk amplifikasi sekuens dari *multiple species*, perancangan primer untuk *highly*

*conserved regions* pada proses deteksi patogen, dan perancangan primer untuk amplifikasi khusus suatu sekuens tunggal (*allele specific primers*).

## Kesimpulan

Perancangan primer pada penelitian ini menghasilkan sepasang primer untuk amplifikasi fragmen gen *sukrosa sintase* (dengan amplikon  $\pm$  1462 bp) berupa 5' AACTTTgTgCTTgA 3' (dengan panjang 14 basa) sebagai primer *forward* dan 5' TCCTTTgACTCCTTC 3' (dengan panjang 15 basa) sebagai primer *reverse*.

## Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pusat Studi Keragaman Mikrob (*Research Center for Microbial Diversity*, RCMD), Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor dan Lembaga Penelitian Universitas Pattimura Ambon atas dukungan dana bagi penelitian ini.

## Daftar Pustaka

- Breslauer, K.J., Frank, R., Blocker, H., Markey, L.A. 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 3746-3750.
- Dieffenbach, C.W. and Dveksler, G.S. 1995. *PCR Primer, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Freier, S.M., Kierzek, R., Jaeger, J.A., Sugimoto, N., Caruthers, M.H., Neilson, T., and Turner, D.H. 1986. Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9373-9377.
- Gordon, A.J., Minchin, F.R., James, C.L., and Komina, O. 1999. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol.*, 120, 867-878.
- Higgins, D.G., Thompson, J.D., and Gibson, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.*, 22, 4673-4680.
- Pearson, W.R. 1990. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP dan FASTA. *Methods Enzymology*, 183, 63-98.
- Rychlik, W. 1995. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Molecular Biotechnology*, 3, 129-134.
- Thummler, F., Verma, D.P.S. 1987. Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. of Biological Chem.*, 262(30), 14730-14736.